

To Study the Culture of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *in Vitro* and Their Proliferation Ability of Diabetic Rats Induced by STZ

Jia Chen, Wenlan Yu, Xiaoli Ma, Shumin Xie, Yonglun Liu

Laboratory Animal Center of South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong
Email: chenjia75@163.com

Received: Jan. 11th, 2018; accepted: Jan. 25th, 2018; published: Feb. 7th, 2018

Abstract

Objective: To explore the proliferation ability of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) by diabetic model rats during different time periods, and make a preliminary discussion of relationship between osteoporosis formed by diabetic and change by biological characteristics of the BMSCs. **Methods:** The diabetic rats were induced by STZ (Streptozotocin) combined with high glucose and high-fat diet, and normal rats were as control group. The whole bone marrow adherence method was used to amplify and purify BMSCs injected with STZ after 4, 8 and 12 weeks, and the third well-grown generation cells were selected. The expression of cell surface markers CD34 and CD29 was detected with Flow cytometry. The cell proliferation ratio index was tested with Cell Count kit-8 (CCK-8). **Results:** The expression of CD29 in cultured cells was positive, and the expression of CD34 was negative. The proliferation of BMSCs of diabetic rats related to the injection time was significantly slower than that of normal rats ($P < 0.01$), and the morphology was more flat than normal cells in morphology. With the increase of time (STZ12 weeks after injection), *in vitro* BMSCs had almost no proliferation, compared with first days of training od seventh days, $P > 0.05$. **Conclusion:** BMSCs derived from diabetic rats can be successfully cultured *in vitro*, but with the increase of time, it has different degrees of damage in the biological characteristics of proliferation ability. The proliferation of BMSCs in diabetic rats may be time-dependent, which may be related to the formation of osteoporosis.

Keywords

Diabetes, Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Proliferation, Osteoporosis, The Rat

链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠骨髓间充质干细胞体外培养观察及其增殖能力检测

陈 嘉, 余文兰, 马晓莉, 谢淑敏, 刘永伦

华南农业大学实验动物中心, 广东 广州
Email: chenja75@163.com

收稿日期: 2018年1月11日; 录用日期: 2018年1月25日; 发布日期: 2018年2月7日

摘要

目的: 研究糖尿病模型大鼠不同时间段体外培养条件下骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)的增殖能力的改变, 初步探讨糖尿病模型骨质疏松形成与BMSCs生物学特性改变的相关性。**方法:** 利用链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)加高糖高脂饲料诱导制作大鼠糖尿病模型, 正常大鼠作为对照组。分别于注射STZ液4、8、12周后, 体外利用全骨髓贴壁法来扩增和纯化BMSCs, 取生长良好的第3代细胞作为本实验的研究对象。流式细胞仪检测细胞表面标志物CD34、CD29的表达。采用Cell Count kit-8 (CCK-8)分别绘制细胞的生长曲线来评价增殖能力。**结果:** 培养的细胞CD29表达为阳性, CD34表达为阴性。注射STZ液4、8、12周后, 来源于糖尿病大鼠的BMSCs的增殖均较正常的大鼠显著性减慢($P < 0.01$), 在形态学上则表现为较正常的细胞更扁平。随着时间的增加(注射STZ12周后), 体外培养的BMSCs几乎没有增殖, 培养第7天的OD值与第1天比较, $P > 0.05$ 。**结论:** 糖尿病大鼠来源的BMSCs可以成功地在体外进行增殖培养, 但是随着时间的增加, 其在增殖能力生物学性状上有不同程度的损害。糖尿病大鼠BMSCs 的增殖影响可能具有一定的时间依赖性, 可能与骨质疏松的形成有一定的关系。

关键词

糖尿病, 骨髓间充质干细胞, 增殖, 骨质疏松, 大鼠

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

糖尿病的发病率呈快速增长的趋势, 根据国际糖尿病联盟(IDF)估计到 2030 年全世界糖尿病患者可能增加到 5.52 亿[1], 成为威胁人类健康的主要疾病之一。骨质疏松是一种进展缓慢的骨代谢性疾病, 据统计世界超过 2.2 亿的人口患有骨质疏松, 发病率已经成为全球常见病、多发病的第 6 位[2]。目前有许多研究表明糖尿病患者发生骨质疏松的风险明显高于非糖尿病患者, 流行病学调查资料显示糖尿病患者骨质疏松的发病率为 40%~60% [3], 其发病机制尚未完全阐明, 且存在许多争议。

最近糖尿病与骨质疏松的相关性越来越受到关注, 因此构建糖尿病骨质疏松动物实验模型, 对其进行深入的研究意义重大。目前国内建立 2 型糖尿病模型多采用高糖高脂饮食加小剂量链脲佐菌素的方法[4] [5] [6], 这种动物模型是否合并有骨质疏松, 目前国内外学者对此鲜有报道。

骨质结构和功能的变化是骨髓干细胞生物学活性变化的结果。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是目前研究较多的成体干细胞之一, 在适宜的诱导下具有向骨、软骨、脂肪、神经等多向分化潜能[7] [8]。糖尿病患者复杂的体内环境, 势必会对自身体内的 BMSCs 产生影响。糖尿病模型大鼠 BMSCs 的生物学性状的改变情况以及是否与骨质疏松相关目前尚未有报道, 本实验通过采用高糖高脂饮食加小剂量链脲佐菌素的方法建立 2 型糖尿病模型, 观察不同时间段糖尿病模型大鼠 BMSCs 体外培养及其增殖能力情况, 旨在研究 BMSCs 的生物学性状的变化是否是糖尿病与骨质疏松的相关性因素之一。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 体质量(180~220) g, 20 只。由广东省医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2013-0002。

2.1.2. 主要药品与试剂

DMEM 培养基(GIBCO)、胎牛血清(GIBCO)、Cell Counting CCK-8kit(晶欣公司)、FITC Hamster Anti-Rat CD29(BD)、PE Mouse Anti-Rat CD34(BD)、Mouse monoclonal IgG1(Santa cruz)等。

2.1.3. 仪器

流式细胞仪(BD FACSCanto II)、酶标仪(Thermo LABSYSTEMS, Ascent)、CO₂ 培养箱(Thermo Forma3111)、显微镜(OLYMPUS, IX71)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 糖尿病大鼠模型的制备

高糖高脂饲料喂养大鼠四周, 35 mg/kg 腹腔注射链 STZ, 3 d 后剪尾静脉测血糖, 以 >16.67 mmol/L 视为糖尿病模型成功[4] [5] [6], 腹腔注射后 3 周复测 1 次尾静脉血糖和体重, 以确保血糖浓度 > 16.67 mmol/L。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

2.2.2. BMSCs 分离培养

分别于注射 STZ 液 4、8、12 周后, 取糖尿病组大鼠及正常对照组大鼠, 10%水合氯醛 0.3 mL/100 g 体质量腹腔注射麻醉, 摘除双侧后肢, 浸泡在 75%乙醇中 5 min, 再用无菌生理盐水冲洗至无乙醇, 置于无菌培养皿上, 剥除股骨、胫骨表面附着的肌肉等组织, 无菌 PBS 反复冲洗。剪断胫、股骨的骨髓端, 5 mL 一次性注射器吸取 DMEM 完全培养液(含 10%胎牛血清、青霉素 100 U/mL 及链霉素 100 μ g/mL)充分冲洗骨髓腔, 至骨髓腔变白为止。原代 BMSCs 培养 24 h 后更换培养液, PBS 清洗 3 次, 以去除未贴壁的细胞。以后每 3d 换液 1 次。当细胞接近 80%铺满瓶底后, 以 2.0×10^5 个/mL 细胞的密度接种于培养瓶中进行扩增培养。

2.2.3. BMSCs 的鉴定

取对数生长期的 P3 细胞, 制成 10^6 个/mL 细胞悬液, 分装每管 100 μ L。各管分别加入 CD34 抗体 10 μ L, 同型阴性对照抗体 20 μ L; CD29 抗体 2 μ L, 同型阴性对照抗体 2 μ L; 室温避光反应 30 min。加 PBS 洗涤后离心去上清。加 500 μ L PBS 重悬细胞, 流式细胞仪上机检测。

2.2.4. CCK-8 法检测

细胞增殖能力取生长良好的第三代 BMSCs, 于 96 孔板的每个孔中加入 100 μ L 细胞悬液, 细胞数为 1.5×10^3 , 培养基每 2 天更换一次。于细胞接种后的 7 d 内, 每天取 5 个孔进行检测, 每个孔内加入 CCK-8 试剂 10 μ L, 置培养箱内孵育 4 h 后, 用全自动酶标仪检测 490 nm (参比波长 630 nm) 的吸光度值(OD 值), 取平均值, 以培养时间为横坐标, 以相应的 OD 值为纵坐标, 描绘生长曲线。

实验重复 3 次。

2.3. 数据处理

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS19.0 统计软件进行处理。比较使用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 正常组大鼠 BMSCs 形态观察和标志抗原 CD29、CD34 表达

原代培养 24 h 并用 PBS 轻轻冲洗 3 次去掉非贴壁的造血干细胞后, 部分细胞贴壁生长并散在分布, 成圆形或短梭形(图 1(a))。原代培养 5 d 后, 细胞增殖迅速, 呈集落样生长, 形态以长梭形为主。培养 7~9 d 后, 超过 80% 的细胞克隆融合, 随着集落不断扩大, 互相融合成片, 细胞趋于梭形, 可传代。传代后, BMSCs 在 2 h 内贴壁生长, 细胞克隆状增殖, 细胞形态较一致, 多为长梭形, 细胞排列更有规律, 呈“漩涡”样生长(图 1(b))。4~5 d 可再传代。随着传代次数的增加, 杂细胞逐渐减少, 细胞得到纯化。第 3 代细胞 CD34 阳性率约 0%、CD29 阳性率达 99.5% (图 2(a), 图 2(b))。

3.2. 正常组大鼠与糖尿病组大鼠细胞形态对比观察

注射 STZ 液 4、8、12 周后, 分别取正常组和糖尿病组大鼠 BMSCs, 相差显微镜下对细胞形态进行了观察, 如图 3(a)所示正常组培养的原代细胞呈长梭型, 集落生长, 中间较密, 夹杂着圆形高亮未贴壁的杂细胞, 但是糖尿病大鼠的 BMSCs 所形成的集落较正常大鼠的明显要小, 无明显的集落形成(图 3(b))。随时间增长, 糖尿病组生长明显较正常的减慢。细胞传代后, 正常大鼠 BMSCs 细胞形态饱满(图 4(a)),

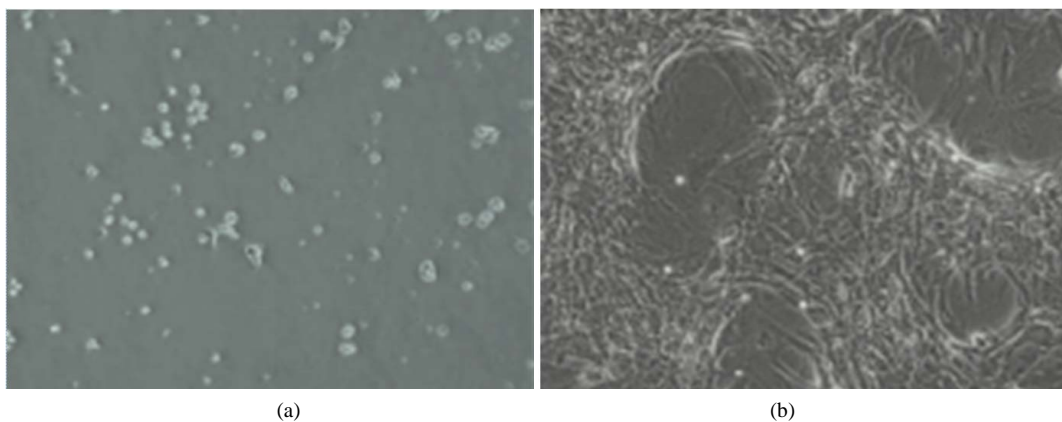


Figure 1. (a) Primary culture of BMSCs for 24 h; (b) the growth situation of BMSCs
图 1. (a) 原代培养 24 h 的 BMSCs ($\times 100$); (b) BMSCs 生长情况($\times 200$)

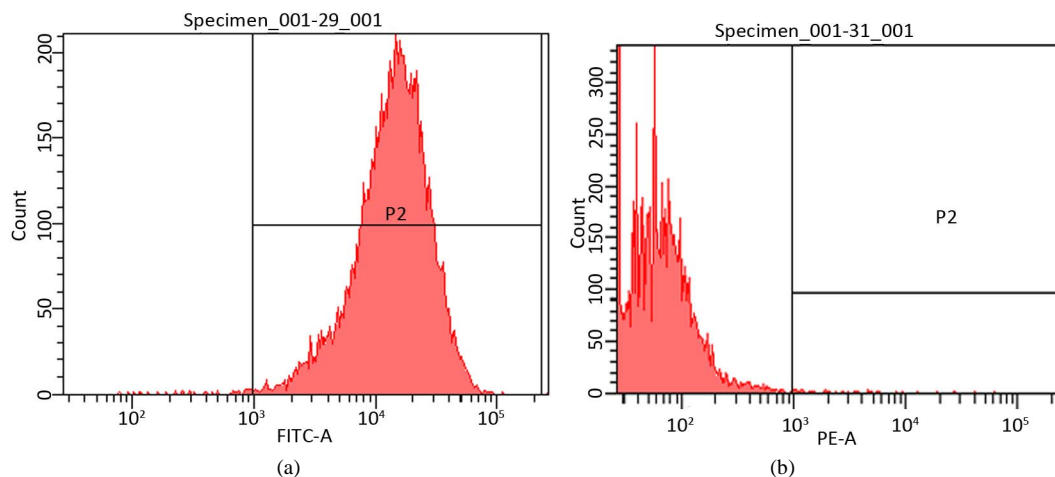


Figure 2. (a) The positive expression of CD29 in P3 cells; (b) the negative expression of CD29 in P3 cells
图 2. (a) P3 细胞 CD29 阳性表达; (b) P3 细胞 CD34 阴性表达

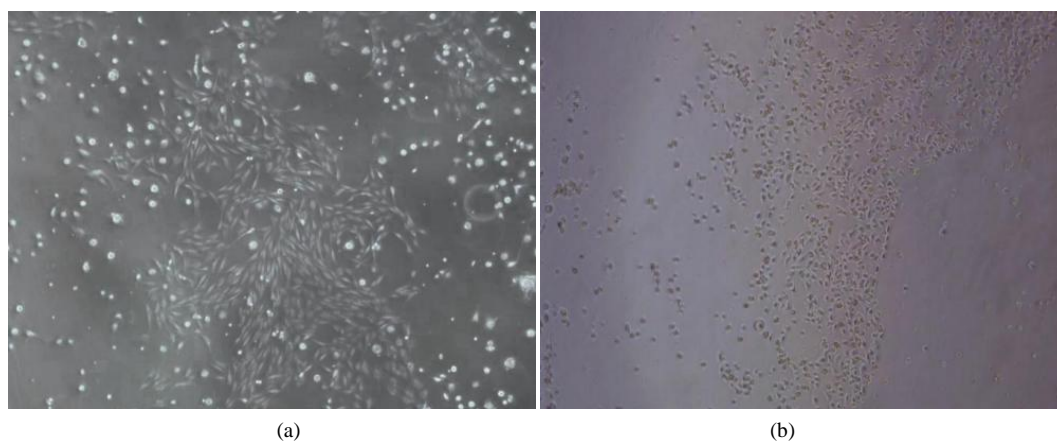


Figure 3. (a) Primary culture of BMSCs for 72 h in control group ($\times 100$); (b) primary culture of BMSCs for 72 h in diabetic group ($\times 100$)

图 3. (a) 正常组原代培养 72 h 的 BMSCs ($\times 100$); (b) 糖尿病组原代培养 72 h 的 BMSCs ($\times 100$)

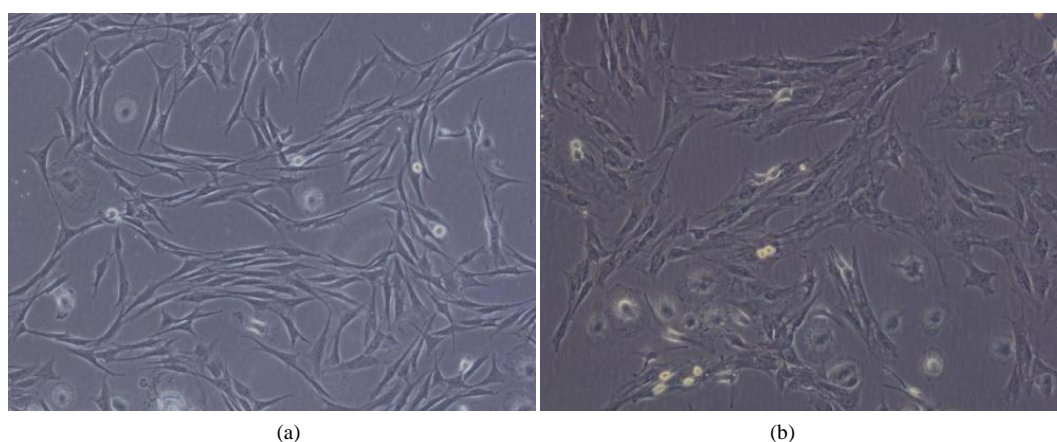


Figure 4. (a) The P3 BMSCs in control group ($\times 200$); (b) the P3 BMSCs in diabetic group ($\times 200$)

图 4. (a) 正常组 P3 的 BMSCs ($\times 200$); (b) 糖尿病组 P3 的 BMSCs ($\times 200$)

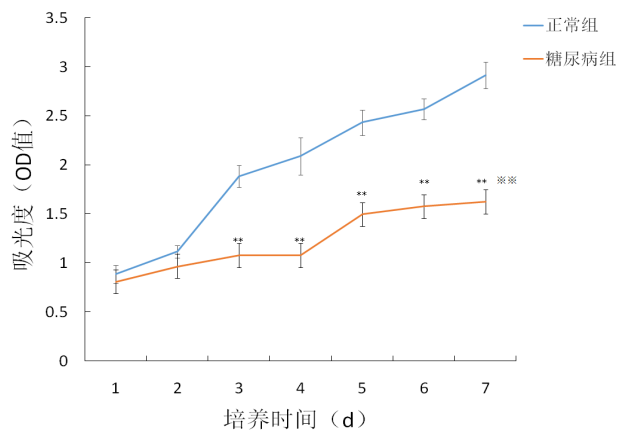
糖尿病组则表现为细胞伸展无力，且较为扁平(图 4(b))。

3.3. CCK-8 法检测细胞增殖能力

注射 STZ 液 4、8、12 周后，分别取第三代正常组和糖尿病组大鼠 BMSCs，于 96 孔板的每个孔中加入 100 μL 细胞悬液，细胞数为 1.5×10^3 ，培养基每 2 天更换一次。于细胞接种后的 7 d 内，每天取 6 个孔进行检测，每个孔内加入 CCK-8 试剂 10 μL ，置培养箱内孵育 4 h 后，用全自动酶标仪检测 490 nm (参比波长 630 nm) 的吸光度值(OD 值)，取平均值，以培养时间为横坐标，以相应的 OD 值为纵坐标，描绘生长曲线。检测的结果显示(见图 5, 图 6, 图 7)，糖尿病组来源的 BMSCs 增殖能力明显较正常来源的低，同一培养天数比较， $P < 0.01$ 。注射 STZ 液 4、8 周后，BMSCs 仍有增殖，第 7 d 的 OD 值与第 1 d 的 OD 值，比较 $P < 0.01$ ， $P < 0.05$ 。注射 STZ 液 12 周后，BMSCs 增殖不明显，第 7 d 的 OD 值与第 1 d 的 OD 值，比较 $P > 0.05$ 。

4. 讨论

BMSCs 是一种骨髓基质内分布的经中胚层细胞分化而来的细胞亚群，是组织工程首选种子细胞[9]。随着对 BMSCs 研究的逐渐深入，其在骨质疏松症发生中可能发挥的重要作用日益引起人们的高度重视。

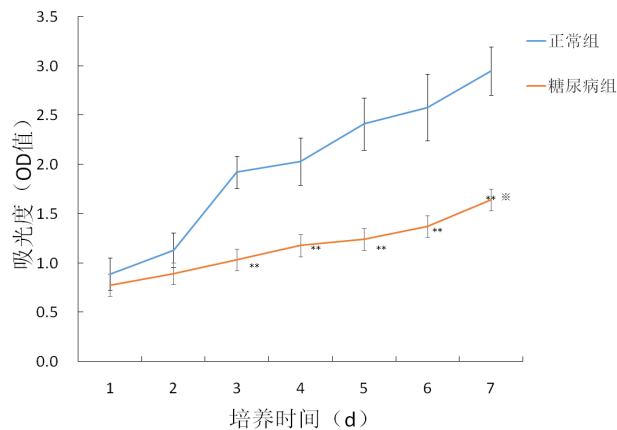


**：与正常组同一培养天数比较， $P < 0.01$

***：与第一天比较， $P < 0.01$

Figure 5. Injection of STZ after four weeks

图 5. 注射 STZ 液 4 周后

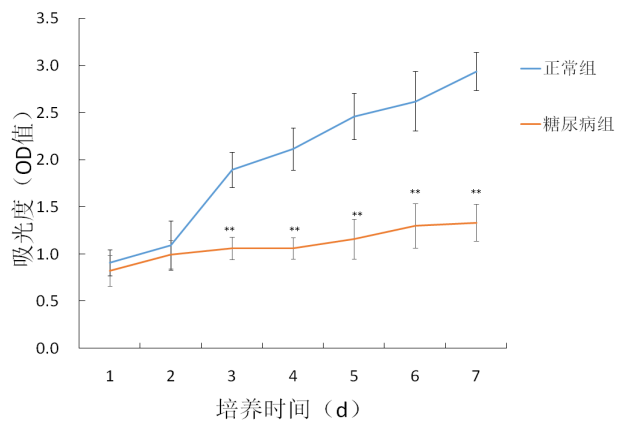


**：与正常组同一培养天数比较， $P < 0.01$

***：与第一天比较， $P < 0.05$

Figure 6. Injection of STZ after eight weeks

图 6. 注射 STZ 液 8 周后



**：与正常组同一培养天数比较， $P < 0.01$

Figure 7. Injection of STZ after twelve weeks

图 7. 注射 STZ 液 12 周后

目前尚无 BMSCs 的特异性标志,对 BMSCs 的特征描述及其分离方法都是以一个细胞群体的形式进行的,它可表达多种表面标记物[10],整合素家族成员 CD29、黏附分子 CD44、CD166 以及 CD105 等是 BMSCs 的重要标志物,而 BMSCs 不表达骨髓造血干细胞的重要标志抗原,如 CD31、CD34 [11]。本实验流式细胞仪检测结果显示, P3 代 BMSCs 不表达 CD34, 表达 CD29, 这符合 BMSCs 的表面标志物特征[12], 说明本实验培养扩增的细胞为 BMSCs。

目前关于糖尿病大鼠来源的 BMSCs 在体外培养的生物学特性尚不清楚,是否存在各种生物学性状的损害及其与骨质疏松发生的相关性尚未明确。在本实验中,我们观察了糖尿病模型大鼠在注射 STZ4、8、12 周后 BMSCs 细胞形态及增殖能力的改变,初步探讨糖尿病模型骨质疏松形成与 BMSCs 变化的相关性。

骨质疏松对 BMSCs 的增殖和分化可能存在着部位因素影响且具有一定的时间依赖性。骨质疏松是一种以骨量减少为特征的骨代谢性疾病,其发病因素众多,各种诱因导致的病理归宿均为骨组织成骨能力弱于破骨能力、骨微结构破坏、骨量丢失、骨强度下降等[13] [14]。BMSCs 广泛存在于全身骨髓组织和松质骨内,作为成骨细胞的前体细胞,对于调控骨吸收和骨形成的相对平衡起着至关重要作用[15] [16]。随着现代分子生物学技术的深入运用,大量资料证明 BMSCs 的异常表现与骨质疏松症的发病密切相关。本实验结果显示,注射 STZ 液 4、8、12 周后,来源于糖尿病大鼠的 BMSCs 的增殖均较正常的大鼠显著性减慢($P < 0.01$),在形态学上则表现为较正常的细胞更扁平。随着时间的增加(注射 STZ12 周后),体外培养的 BMSCs 几乎没有增殖,说明但是随着时间的增加,其在增殖能力生物学性状上有不同程度的损害。糖尿病大鼠 BMSCs 的增殖影响可能具有一定的时间依赖性,可能与骨质疏松的形成有一定的关系。研究结果提示在骨质疏松状态下 BMSCs 的生物学活性异常,其活性对于疾病的发展及转归具有重要意义。

基金项目

广东省科技计划项目(2015A030302068): 链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠骨质疏松发生机制的研究。

参考文献 (References)

- [1] Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C., *et al.* (2011) IDF Diabetes Atlas: Global Estimates of the Prevalence of Diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **94**, 311-321. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.029>
- [2] 孙权, 姜广建, 张文生. 骨质疏松症治疗药物的研究进展[J]. 中国综合临床, 2014, 30(13): 103-105.
- [3] 高照华. 内分泌代谢疾病相关性骨质疏松的研究进展[J]. 中国实验诊断, 2013, 17(3): 590-593.
- [4] 邵俊伟, 蔡逊, 马丹丹, 等. SD 大鼠 2 型糖尿病模型的建立与评价[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2014, 21(10): 1212-1215.
- [5] 张燕, 杨秋萍, 赵燕, 等. 2 型糖尿病大鼠骨质疏松模型的建立[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(40): 6041-6047.
- [6] 刘光源, 戴慕巍, 田发明, 等. 高脂饲料配合链脲佐菌素诱导 2 型糖尿病模型大鼠的椎间盘形态[J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(12): 1883-1888.
- [7] Hildebolt, C.F., Pilgram, T.K., Dotson, M., *et al.* (2004) Estrogen and /or Calcium plus Vitamin D Increase Mandibular Bone Mass. *Journal of Periodontology*, **75**, 811-816. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.6.811>
- [8] Mudda, J.A. and Bajaj, M. (2011) Stem Cell Therapy: A Challenge Toperiodontist. *Indian Journal of Dental Research*, **22**, 132-139. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.79978>
- [9] Gu, W., Hong, X., Potter, C., *et al.* (2017) Mesenchymal Stem Cells and Vascular Re-Generation. *Microcirculation*, **24**, 1-15. <https://doi.org/10.1111/micc.12324>
- [10] Opiela, J., Samiec, M., Bochenek, M., *et al.* (2013) DNA Aneuploidy in Porcine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Undergoing Osteogenic and Adipogenic *In Vitro* Differentiation. *Cell Rerogram*, **15**, 425-434. <https://doi.org/10.1089/cell.2012.0099>

-
- [11] Thompson, B., Varticovski, L., Baek, S., *et al.* (2016) Genome-Wide Chromatin Landscape Transitions Identify Novel Pathways in Early Commitment to Osteoblast Differentiation. *PLoS ONE*, **11**, e0148619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148619>
- [12] Mishra, D.K., Veena, U., Kaliki, S., *et al.* (2016) Differential Expression of Stem Cell Markers in Ocular Surface Squamous Neoplasia. *PLoS ONE*, **11**, e0161800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161800>
- [13] Jonasson, G. and Rythen, M. (2016) Alveolar Bone Loss in Osteoporosis: A Loaded and Cellular Affair. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, **13**, 95-103. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S92774>
- [14] Rossini, M., Gatti, D. and Adami, S. (2013) Involvement of WNT/Beta-Catenin Signaling in the Treatment of Osteoporosis. *Calcified Tissue International*, **93**, 121-132. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9749-z>
- [15] Giustina, A., Mazziotti, G. and Canalis, E. (2008) Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factors, and the Skeleton. *Endocrine Reviews*, **29**, 535-559. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0036>
- [16] Ge, C., Yang, Q., Zhao, G., *et al.* (2012) Interactions between Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and p38 MAPkinase Pathways in the Control of RUNX2 Phosphorylation and Transcriptional Activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, **27**, 538-551. <https://doi.org/10.1002/jbmr.561>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org